



УДК 547.588.15:547.992

НОВЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ПОЛИМЕР 3-(3,4-ДИГИДРОКСИФЕНИЛ)ГЛИЦЕРИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ДВУХ ВИДОВ ОКОПНИКА, *Symphytum asperum* И *S. caucasicum* (Boraginaceae)

© 2002 г. В. В. Барбакадзе*, Э. П. Кемертелидзе*,
И. Л. Таргамадзе*, А. С. Шашков**, А. И. Усов***

* Институт фармакохимии им. И.Г. Кутателадзе АН Грузии, 380059, Тбилиси, ул. П. Сараджиивили, 36;

** Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 25.10.2001 г. Принята к печати 29.10.2001 г.

На основании данных ИК- и ЯМР-спектроскопии установлено, что высокомолекулярные водорастворимые препараты с высокой антикомплементарной и антиоксидантной активностью, выделенные из корней *Symphytum asperum* и *S. caucasicum*, представляют собой главным образом поли[окси-1-карбокси-2-(3,4-дигидроксифенил)этилен].

Ключевые слова: *Symphytum asperum*, *Symphytum caucasicum*; поли[окси-1-карбокси-2-(3,4-дигидроксифенил)этилен], 3-(3,4-дигидроксифенил)глицериновая кислота; кофейная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании полисахаридного состава ряда растений флоры Кавказа, используемых в народной медицине [1], было найдено, что суммарные полисахаридные препараты из корней окопника шершавого *Symphytum asperum* и окопника кавказского *S. caucasicum* (семейство бурачниковых, Boraginaceae), в отличие от полисахаридов других растений, проявляют высокую антикомплементарную активность и способны эффективно поглощать свободные радикалы [2]. Главными полисахаридными компонентами этих препаратов являются разветвленные глюкофруктаны, строение которых было установлено с помощью химических методов анализа и спектроскопии ЯМР [3].

Для определения химической природы активных компонентов оба суммарных полисахаридных препарата фракционировали ультрафильтрацией на мембранных фильтрах, причем главная антикомплементарная активность сохранялась во фракциях с молекулярной массой, превышающей 1 млн. Да. Эти высокомолекулярные фракции частично растворялись в вероналовом буфере рН 7.35, причем активность обнаруживалась в растворе. Растворимую фракцию из *S. asperum* дополнительно разделяли гель-хроматографией на колонке с сефарозой 2В. В результате описанных приемов фракционирования удалось удалить большую часть полисахаридов и получить водорастворимые (в виде Na-солей) высокомолекуляр-

ные (>1000 кДа) препараты **1** и **2** соответственно из *S. asperum* и *S. caucasicum* [2]. Они содержали некоторое количество углеводов (25.7 и 26.9%) и небольшое количество белка (N 1.1 и 2.1% соответственно). Моносахаридный состав углеводной части препаратов резко отличался от состава исходных полисахаридных экстрактов, где преобладала фруктоза. В препаратах **1** и **2** этот моносахарид обнаруживался лишь в незначительных количествах, а наряду с ним были найдены рамноза, арабиноза, манноза, глюкоза, галактоза и уроновые кислоты [2]. В УФ-спектрах обоих препаратов наблюдались три полосы поглощения (полоса умеренной интенсивности при 252 нм и две интенсивные полосы при 282 и 286 нм). Препараты показывали высокую антикомплементарную активность*, которая резко уменьшалась при обработке их растворов кожным порошком. На основании этих данных было предположено, что выделенные вещества являются полимерами фенольной природы [2]. В наших предварительных сообщениях показано, что главным компонентом препарата **1** является регулярно замещенный поли(оксиэтилен), а именно, поли[окси-1-карбокси-2-(3,4-дигидроксифенил)этилен] [5, 6]. В настоящей работе приводятся данные сравнительного изучения препаратов **1** и **2** с использованием ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Автор для переписки (тел.: (095) 137-67-91; факс: (095) 135-53-28; эл. почта: usov@ioc.ac.ru).

* Новые данные о биологической активности препаратов из *S. asperum* см. в работе [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИК-спектры препаратов **1** и **2** идентичны и содержат полосы поглощения, типичные для фенолкарбоновых кислот [7] (cm^{-1}): 3420 (ОН), 2930 (СН), 1620 (ионизированный карбоксил), 1600, 1510, 1450 (ароматические С=C), 1410, 1220 (фенолы), 1270, 1130, 1075, 1030 (R-O-R'), 880 (С-Н в ароматическом ядре, один изолированный атом водорода), 830 (С-Н в ароматическом ядре, два соседних атома водорода).

Спектры ЯМР ^{13}C препаратов **1** и **2** также полностью идентичны. Интересно отметить, что в этих спектрах практически не проявляются сигналы углеводных компонентов препаратов, вероятно, из-за их пестрого моносахаридного состава, а наблюдаются лишь девять четких сигналов углеродных атомов фрагмента замещенной фенилпропионовой кислоты (рис. 1). Из спектра, полученного с помощью техники АРТ [8] (рис. 2), следует, что пять сигналов относятся к группам СН, а четыре – к непротонированным атомам углерода. Два сигнала с химическими сдвигами 78.2 и 80.4 м.д., очевидно, принадлежат протонированным алифатическим атомам углерода, связанным с кислородом. Шесть сигналов были отнесены к ароматическим атомам углерода (протонированным – при 117.4, 118.6, 122.3 м.д. и непротонированным – при 131.5, 143.8 и 144.6 м.д.). Уширенный сигнал при 175.4 м.д. обусловлен наличием в веществе карбоксильной группы.

Спектры ЯМР ^1H обоих препаратов также практически идентичны (рис. 3). Они содержат четыре сигнала с химическими сдвигами 4.88, 5.33, 7.13 и 7.24 м.д., один из которых (7.13 м.д.) имеет удвоенную интенсивность. К сожалению, эти сигналы уширены, так что нет возможности определить константы спин-спинового взаимодействия. Двумерный гетероядерный $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC-спектр (рис. 4) показывает следующие корреляции между протонами и атомами углерода: 4.88/80.4, 5.33/78.2, 7.13/118.6, 7.13/122.3 и 7.24/117.4 м.д.

Хорошее разрешение и узкая форма сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C свидетельствуют, что вещества представляют собой регулярные полимеры. Как уже указано в наших предыдущих сообщениях [5, 6], согласно спектральным данным, в основе полимерной молекулы лежит цепь поли(оксиэтилена). Два углеродных атома повторяющегося звена этой цепи регулярно замещены дигидроксифенильной и карбоксильной группой соответственно (схема и таблица). Наличие гидроксильных групп в положениях 3 и 4 фенильного ядра было однозначно установлено экспериментом 1D-NOE, выполненном в разностном варианте. Предоблучение протона в положении 1 с химическим сдвигом 5.33 м.д. вызывало NOE на двух ароматических протонах с химическими сдвигами 7.13 и 7.24 м.д. Эти протоны, следовательно, занимают положения 2 и 6 в фенильном ядре. Таким образом, гидроксильные группы не могут занимать *орто*-положения. Разные величины NOE для этих

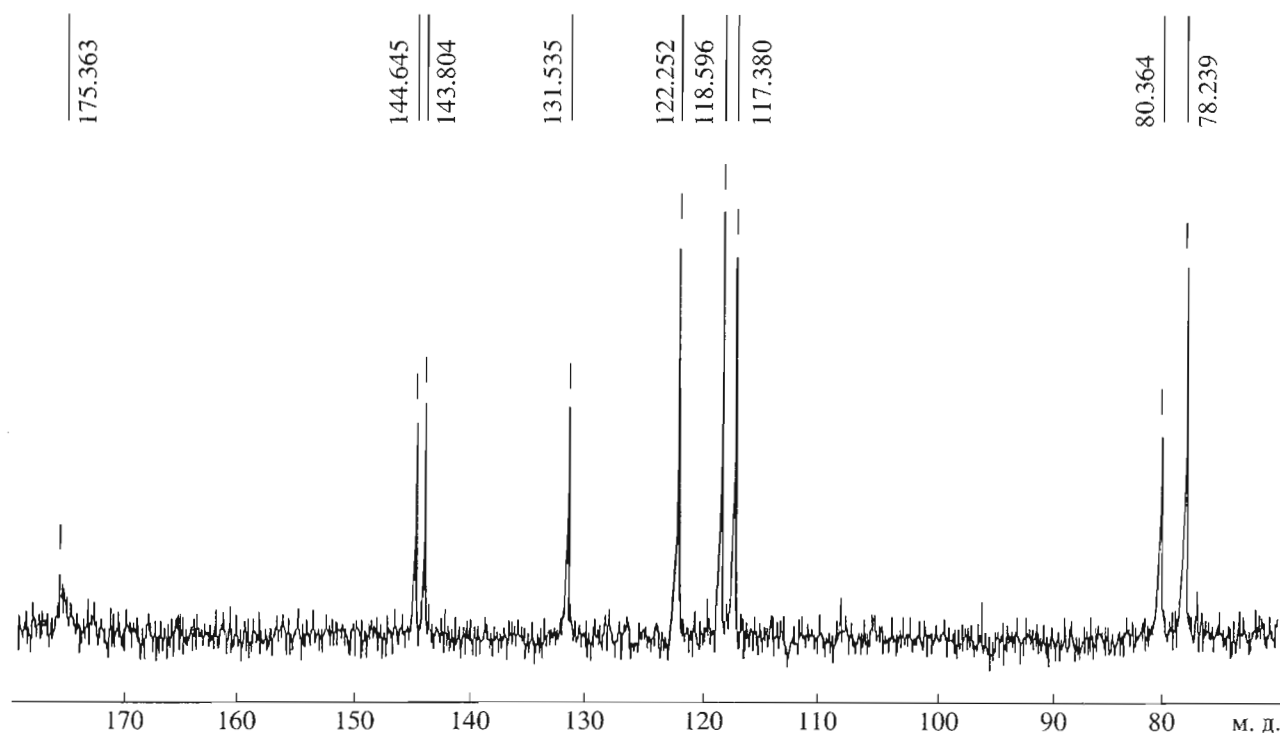


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР препарата 1.

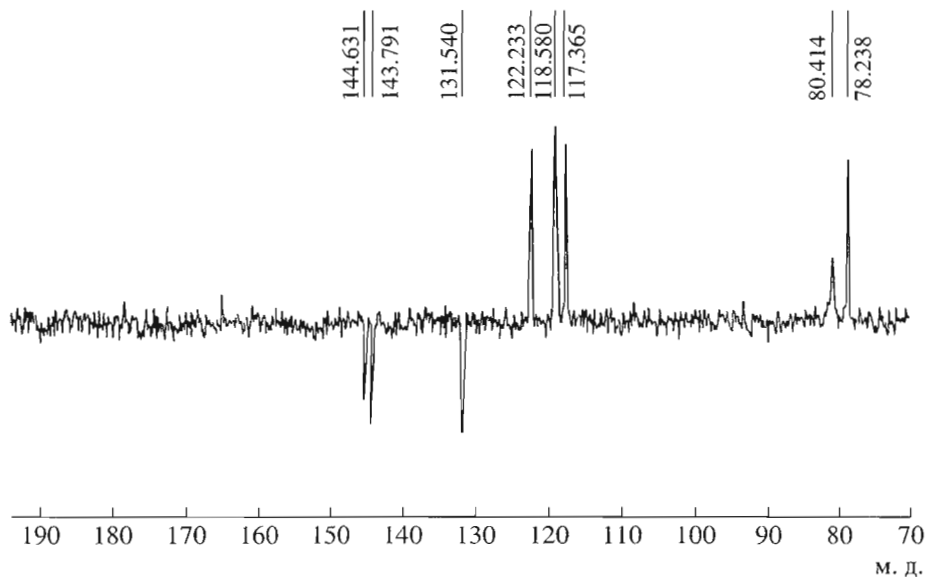
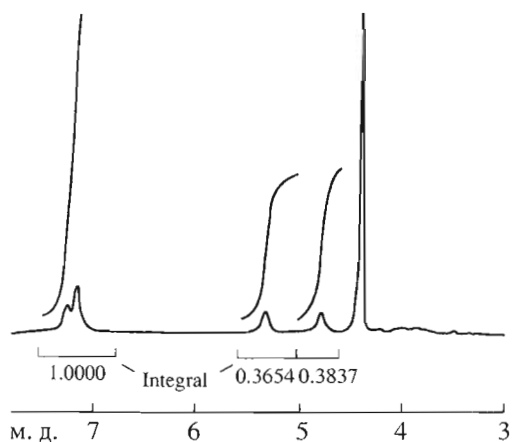


Рис. 2. Спектр АРТ препарата 1.

двух протонов, разные химические сдвиги их сигналов в спектре ЯМР ^1H и различное положение резонансов соответствующих атомов углерода в спектре ЯМР ^{13}C исключают возможность симметричного бис-*мета*-замещения ароматического кольца двумя гидроксильными группами. Таким образом, главные компоненты обоих выделенных препаратов **1** и **2** представляют собой поли[окси-1-карбокси-2-(3,4-дигидроксифенил)этилен]. Повторяющееся звено этого полиэфира содержит два асимметрических углеродных атома, но мы пока не располагаем данными о пространственной конфигурации этих хиральных центров.

Различные фенилпропаноиды являются хорошо известными фрагментами лигнанов и структурных полимеров клеточной стенки растений. Так, главными звеньями лигнина служат лигнолы

[9, 10], тогда как арилпропионовые кислоты в большом количестве входят в состав ароматической части суберина [10, 11]. Как лигнин, так и суберин представляют собой высокомолекулярные, трехмерные шитые полимеры нерегулярной структуры, практически нерастворимые в воде. Сведения об их строении основаны главным образом на данных, полученных при химических расщеплениях [12, 13]. Спектры ЯМР ^{13}C лигнина и суберина, полученные для образцов в твердом состоянии, дают весьма ограниченную структурную информацию [14, 15]. Напротив, препараты **1** и **2** по растворимости и поведению при фракционировании очень похожи на растительные слизи полисахаридной природы. Как видно из приведенного материала, спектроскопия ЯМР оказалась наиболее эффективным методом установления их строения. Хотя прямое сравнение спектров ЯМР ^{13}C твердых образцов лигнина или суберина и растворов соединений **1** и **2** не вполне правомочно, предложенное в данной работе отнесение сигналов в спектре ЯМР ^{13}C не противоречит имеющимся литературным данным по спектрам лигнина [15], суберина [16], ряда низкомолекулярных природных соединений, включающих фрагменты 3-(3,4-дигидроксифенил)молочной [17] или 3-(3,4-дигидроксифенил)глицериновой кислоты [18], и модельных производных кофейной кислоты [19].

Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР препарата 1.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что главным структурным элементом обоих высокомолекулярных водорастворимых препаратов, выделенных из корней *S. asperum* и *S. caucasicum*, является один и тот же поли[окси-1-карбокси-2-(3,4-дигидроксифенил)этилен]. Он представитель нового класса природных простых

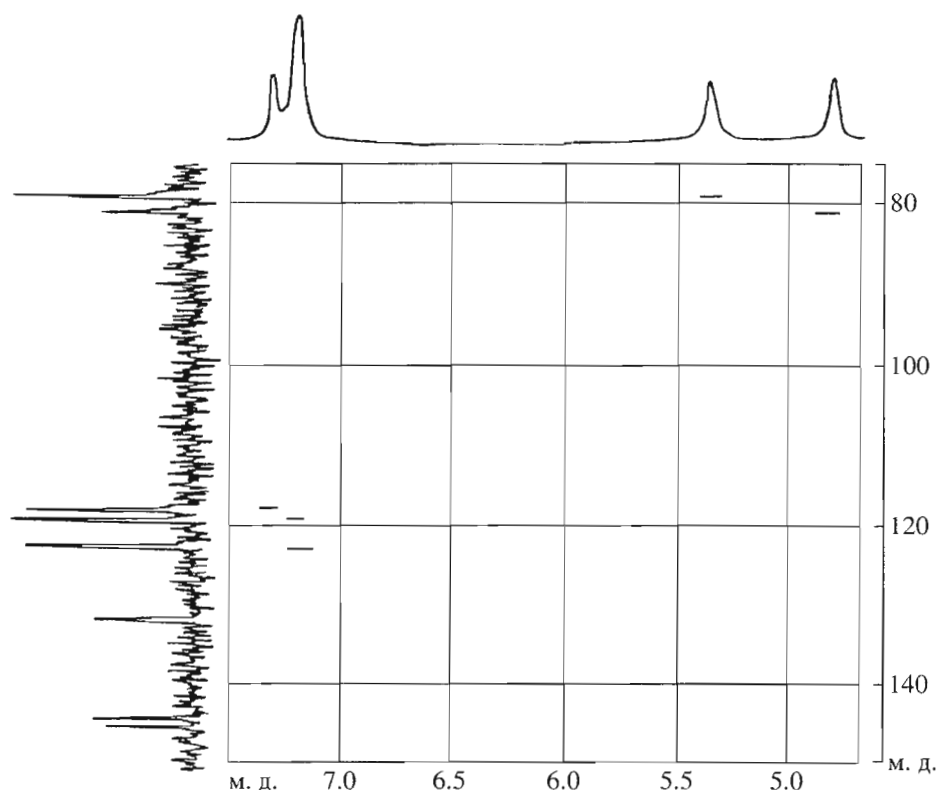


Рис. 4. Спектр HSQC препарата 1.

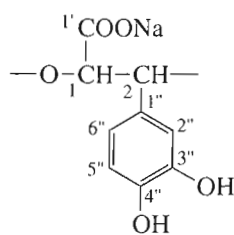
полиэфиров, повторяющимся звеном молекулы которого служит остаток 3-(3,4-дигидроксифенил)глицериновой кислоты. Мы не располагаем сведениями о пути образования такого полимера в растении, но с химической точки зрения этот процесс можно представить как эпоксидование двойной связи в кофейной кислоте с последующей полимеризацией образовавшегося эпоксида.

Близостью химической природы обоих препаратов, очевидно, объясняется сходство их антикомплемментарной и антиоксидантной активности [2]. В то же время препарат 2 несколько менее растворим в воде, чем 1, что может объясняться большей молекулярной массой препарата 2 или тонкими различиями в строении, которые не проявляются в спектрах ЯМР. Выявление этих различий, включая определение структурного значения остаточных углеводов, и дальнейшее изучение биологической активности выделенных полимеров будут предметом нашей последующей работы. Какова физиологическая функция этих полиэфиров в растении, является ли их биосинтез уникальным свойством рода *Symphytum*, или подобные вещества образуются и в других растениях, должны показать дальнейшие исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Суммарные препараты водорастворимых полисахаридов из корней *S. asperum* и *S. caucasicum* получали как описано в работе [1]. Препараты 1

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H препаратов 1 и 2



Номер атома	Химический сдвиг ^{13}C , δ , м.д.	Химический сдвиг ^1H , δ , м.д.
1'	175.4	
1	78.2	5.33
2	80.4	4.88
1''	131.5	
2''	117.4	7.24
3''	144.6	
4''	143.8	
5''	118.6	7.13
6''	122.3	7.13

(ранее [2] обозначенный как S.a. > 1000 кДа (sol)) и 2 (ранее [2] обозначенный как S.c. > 1000 кДа) выделяли по методике, приведенной в работе [2].

ИК-спектры в таблетках КВг регистрировали на спектрофотометре Perkin-Elmer 571. Спектры ЯМР получали на спектрометре Bruker DRX-500 для 2% растворов полимеров в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 70–80°C с ацетоном (δ_{H} 2.225 м.д., δ_{C} 31.45 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Время предоблучения для 1D-NOE эксперимента 1 с, сигнал предоблученного протона в разностном спектре принимали за 100%. Двумерный HSQC-спектр получали, используя стандартное программное обеспечение фирмы Bruker.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барбакадзе В.В., Гахокидзе Р.А., Шенгелия З.С., Усов А.И. // Химия природн. соед. 1989. № 3. С. 330–335.
2. Barbakadze V., Kemertelidze E., Targamadze I., Usov A.I., Kroes B.H., Quarles van Ufford L., van den Worm E., Beukelman K.J., van den Berg B.J.J., Labadie R.P. // Trans-Caucasian J. Immunol. 1999. V. 1. P. 21–35.
3. Барбакадзе В.В., Кемертелидзе Э.П., Деканосидзе Г.Е., Беручаишвили Т.Г., Усов А.И. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 671–679.
4. Barthomeuf C.M., Debiton E., Barbakadze V.V., Kemertelidze E.P. // J. Agric. Food. Chem. 2001. V. 49. P. 3942–3946.
5. Barbakadze V., Kemertelidze E., Targamadze I., Shashkov A.S., Usov A.I., Kroes B.H., van den Berg B.J.J., Labadie R.P. // Trans-Caucasian J. Immunol. 2000. V. 2. P. 27–33.
6. Barbakadze V.V., Kemertelidze E.P., Shashkov A.S., Usov A.I. // Mendeleev Commun. 2000. V. 10. P. 148–149.
7. Dyer M.A. // Application of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds / Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York, 1965.
8. Patt S.L., Schoolery J.N. // J. Magn. Reson. 1982. V. 46. P. 535–539.
9. Higuchi T. // Encyclopedia of Plant Physiology. Plant Carbohydrates II. Extracellular Carbohydrates / Eds Tanner W., Loewus F.A. Berlin: Springer-Verlag, 1982. V. 13B. P. 194–224.
10. Lewis N.G. // Current Opinion in Plant Biology. 1999. V. 2. P. 153–162.
11. Bernards M.A., Lewis N.G. // Phytochemistry. 1998. V. 47. P. 915–933.
12. Bernards M.A., Lopez M.L., Zajicek J., Lewis N.G. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 7382–7386.
13. Lapierre C., Pollet B., Negrel J. // Phytochemistry. 1996. V. 42. P. 949–953.
14. Zeier J., Schreiber L. // Plant Physiol. 1997. V. 113. P. 1223–1231.
15. Eberhardt T.L., Bernards M.A., He L., Davin L.B., Wooten J.B., Lewis N.G. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21088–21096.
16. Stark R.E., Sohn W., Pacchiano R.A., Al-Bashir M., Garbow J.R. // Plant Physiol. 1994. V. 104. P. 527–533.
17. Kelley C.J., Harruff R.C., Carmack M. // J. Org. Chem. 1976. V. 41. P. 449–455.
18. Tezuka Y., Kasimu R., Li J.X., Basnet P., Tanaka K., Namba T., Kadota S. // Chem. Pharm. Bull. 1998. V. 46. P. 107–112.
19. Ralph J., Helm R.F., Quideau S.J. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1992. P. 2971–2980.

Poly[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)glyceric Acid]: A New Biologically Active Polymer from the Comfrey Species *Symphytum asperum* and *S. caucasicum* (Boraginaceae)

V. V. Barbakadze*, E. P. Kemertelidze*, I. L. Targamadze*, A. S. Shashkov**, and A. I. Usov***

Phone: +7 (095) 137-6791; fax: +7 (095) 135-5328; e-mail: usov@ioc.ac.ru

*Kutateladze Institute of Pharmacochemistry, Academy of Sciences of Georgia, ul. P. Saradzhishvili 36, Tbilisi, 380059 Georgia

**Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, 119991 Russia

Two high-molecular water-soluble preparations with high anticomplement and antioxidant activity were isolated from the roots of *Symphytum asperum* and *S. caucasicum*. Their main chemical constituent was found to be poly[oxy-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylene] according to IR and NMR spectroscopy. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: caffeic acid, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)glyceric acid, poly[oxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)oxyethylene], *Symphytum asperum*, *Symphytum caucasicum*